

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2003-0015744
Application Number

출원년월일 : 2003년 03월 13일
Date of Application MAR 13, 2003

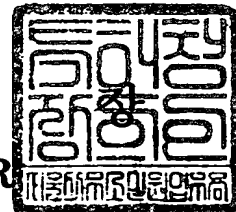
출원인 : 한미약품 주식회사
Applicant(s) HANMI PHARM. IND. CO., LTD.



2003 년 07 월 15 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.03.13
【발명의 명칭】	혈중 안정성이 증가된 생리 활성 폴리펩티드의 융합 단백질 및 이의 제조 방법
【발명의 영문명칭】	FUSION PROTEIN OF A PHYSIOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDE HAVING ENHANCED STABILITY IN BLOOD AND PROCESS FOR THE PREPARATION THEREOF
【출원인】	
【명칭】	한미약품공업 주식회사
【출원인코드】	1-1998-004411-2
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	1999-056327-8
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	1999-023919-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김영민
【성명의 영문표기】	KIM,Young Min
【주민등록번호】	690813-1148928
【우편번호】	449-900
【주소】	경기도 용인시 기흥읍 고매리 877 매화마을 우남드림밸리 102동 803 호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김대진
【성명의 영문표기】	KIM,Dae Jin
【주민등록번호】	741128-1066712

【우편번호】	137-049
【주소】	서울특별시 서초구 반포본동 구반포아파트 28동 402호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	배성민
【성명의 영문표기】	BAE,Sung Min
【주민등록번호】	730529-1109410
【우편번호】	151-054
【주소】	서울특별시 관악구 봉천4동 1587-8 303호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	임창기
【성명의 영문표기】	LIM,Chang ki
【주민등록번호】	700104-1156311
【우편번호】	463-110
【주소】	경기도 성남시 분당구 불정동 한진아파트 803-1401
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	권세창
【성명의 영문표기】	KWON,Se Chang
【주민등록번호】	630620-1024818
【우편번호】	143-210
【주소】	서울특별시 광진구 광장동 현대8차 802동 2205호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이관순
【성명의 영문표기】	LEE,Gwan Sun
【주민등록번호】	600110-1471553
【우편번호】	138-130
【주소】	서울특별시 송파구 오금동 우창아파트 3동 404호
【국적】	KR
【심사청구】	청구

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
이현실 (인) 대리인
장성구 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 20 면 20,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 21 항 781,000 원

【합계】 830,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 생체 내 잔존시간이 짧은 생리 활성 단백질의 생체 내 반감기를 증가시키기 위한 융합 단백질 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 구체적으로, 생리 활성 폴리펩티드, 링커로서 양쪽에 반응기를 가진 수용성 중합체 및 면역글로불린으로 구성되며, 수용성 중합체에 의해서 공유결합으로 연결된 본 발명의 융합 단백질은 생리 활성 폴리펩티드의 혈중 반감기를 증가시키고 생리 활성을 개선시키면서도 면역 반응 유발의 위험이 없는 장점이 있다. 또한, 상기 융합 단백질을 제조하기 위한 본 발명의 화학적 제조 방법에 의하면 유전자 조작에 의한 융합 단백질 생산보다 간편하고 빠르게 다양한 종류의 융합 단백질을 제조할 수 있고, 위치 선택적 면역글로불린의 커플링으로 보다 증가된 혈중 반감기를 갖는 융합 단백질을 제조할 수 있다.

【대표도】

도 4

【명세서】**【발명의 명칭】**

혈중 안정성이 증가된 생리 활성 폴리펩티드의 융합 단백질 및 이의 제조 방법
{FUSION PROTEIN OF A PHYSIOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDE HAVING ENHANCED STABILITY IN
BLOOD AND PROCESS FOR THE PREPARATION THEREOF}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 커플링 반응 후 생성된 hGH-PEG-IgG 융합 단백질을 확인하기 위한 SDS-PAGE 결과이다.

도 2는 커플링 반응 후 생성된 IFN-PEG-IgG 융합 단백질을 확인하기 위한 SDS-PAGE 결과이다.

도 3은 hGH-PEG-IgG를 환원조건으로 만들어 IgG의 경쇄 또는 중쇄 아미노 말단에 커플링된 hGH를 확인하는 SDS-PAGE 결과이다.

도 4는 랫트(Rat)에서 40 kDa PEG-hGH 와 hGH-PEG-IgG의 혈중 반감기를 확인하기 위한 약물동력학 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<5> 유전공학을 이용한 단백질 의약품의 개발에 있어서 단백질의 효능을 극대화 시키려는 노력이 계속되어 왔다. 대부분의 재조합 단백질은 혈중 잔류기간이 매우 짧으므로, 이를 극복하여 단백질 의약품의 혈중 농도 및 역가를 오랫동안 지속시켜 주려는 연구가 활발히 진행되어 왔다. 단백질 의약품은 짧은 혈중 잔류시간 때문에 자주 주사를 맞아야 한다는 것이 커다란 단점이 될 뿐만 아니라, 단백질 의약품의 효과를 최대한 발휘할 수 없는 원인이 되기도 한다. 단백질 의약품의 혈중 잔류시간을 증가시킴으로써 자주 주사를 맞아야 하는 불편함을 해소할 수 있을 뿐만 아니라 혈중 약물의 농도를 오랫동안 유지하여 약효를 훨씬 높여주는 이익도 기대할 수 있을 것이다.

<6> 단백질 의약품은 일반적으로 안정성이 낮아 쉽게 변성되거나, 혈중에서 프로테아제 등에 의해 쉽게 제거되거나 또는 신장이나 간에서 소실되는 것으로 알려져 있다. 따라서 이런 문제점을 극복하기 위하여 단백질의 용해도를 높이고 프로테아제 접촉 및 신장 소실을 억제하기 위하여 단백질 표면에 적당한 고분자를 화학적 또는 생물학적 방법으로 부착하는 연구가 진행되어 왔다. 이러한 표면 구조의 변화가 단백질의 역가에 영향을 주거나 항체를 유도하지 않도록 하는 것이 가장 중요한데, 링커를 이용한 중합체는 표면 구조의 변화로 장기간 투여시에는 항체를 유도할 가능성이 있다. 또한, 고분자를 결합시켜 단백질의 혈중 안정성을 증가시키는 것으로서 대부분의 단백질에 적용될 만큼 뛰어난 기술은 아직까지 개발되지 못한 상태이다.

- <7> 일반적으로, 용해도가 높은 고분자를 화학적으로 부가시켜 약물의 혈중 안정성을 증가시키는데 가장 많이 사용되고 있는 고분자는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로서, 이의 분자량에 따라 단백질의 혈중 안정성이 증가하고, 용해도 역시 다소 증가하는 것으로 알려져 있다. PEG는 목적 단백질의 특정 부위에 결합시키거나 여러 부위에 비 특이적으로 결합시킬 수 있으며, 단백질의 가수분해를 방지하고(Sada 등, J Fermentation bioengineering, 1991, 71: 137-139), 항원성 감소 및 긴 체내 잔류시간 유지에 효과가 있다. 또한 PEG를 부착시킨 단백질이 임상실험에서도 특별한 부작용을 일으키지 않아 많이 사용되고 있다. 그러나 많은 양의 단백질을 주사할 경우 체내에서 PEG의 제거가 늦어 분자량이 큰 PEG를 장기적으로 주사할 경우 문제가 야기될 수도 있을 것이다. 그리고 혈중 안정성이 PEG 분자량 크기와 밀접한 관계가 있으나 분자량 40,000 달톤 이상의 PEG 제조가 쉽지 않고, 분자량이 증가할수록 단백질과의 반응성이 낮아 수율이 떨어질 뿐만 아니라 단백질 자체의 역가도 급격히 떨어지는 것으로 알려져 있다.
- <8> 생리 활성 단백질의 생체 내 안정성을 높이는 다른 방법으로 혈중 안정성이 높은 단백질을 리간드로서 직접 결합시키는 연구도 진행된 바 있으나 기대한 만큼의 혈중 안정성을 나타내지 않거나, 비특이적 결합으로 인해 정제된 융합단백질을 얻기 어려웠다.
- <9> 리간드를 목적 단백질과 연결하는 수단은 크게 화학적 링커(chemical linker)와 PEG 링커의 두 가지로 분류할 수 있다.
- <10> 미국 특허 제5,045,312호에서는, 리간드로서 소 혈청 알부민(Bovine Serum Albumin: BSA) 또는 마우스 면역글로불린을 카보디이미드(Carbodiimide) 및 글루타르알데히드(Glutaraldehyde)와 같은 화학적 링커를 사용하여 결합시키고자 시도한 바 있으나, 혈중 반감기 및 생체의 역가에 대한 언급은 없이 단지 반응 혼합물을 직접 주사

하여 생체내 효력이 2배 정도 증가하였다고 보고한 바 있다. 일반적으로 화학적 링커를 사용한 화학적 커플링 반응에서는 동종 이량체 생성 가능성과 링커의 비 특이적 결합으로 인해 균질한 조성물을 얻기 어렵다는 단점이 있는데, 상기 특허에서도 혈중 반감기의 증가보다는 오히려 동종 이량체로 인한 역가 증가 현상만 나타났다고 볼 수 있고 안정성 증가 효과를 명확하게 보여주지 못했다. 화학적 링커 사용시 또 하나의 단점인 면역 반응 유발 문제도 해결되어야 할 과제이다.

- <11> 그러므로, 이러한 화학적 링커의 단점을 극복하고 목적 단백질의 생체 활성 및 혈중 반감기의 증가 또는 분자량이 상대적으로 큰 PEG 연결 등의 목적으로 PEG 링커가 사용되기도 하였다. 미국 특허 제5,738,846호에서는 분자량 8,000 달톤의 PEG를 링커로 사용하여 인터페론 이량체를 만들었으나 PEG는 인터페론의 라이신 잔기에 비특이적으로 결합하였으며, 균질하지 못한 이량체가 생산되었고, 활성 증가 효과도 뚜렷하지 않았다.
- <12> 국제 출원 공개 제WO 92/16221호에서는 인터루킨-1 수용체 억제제(IL-1 ra) 와 TNF 저해제의 각 유리 -SH 그룹을 분자량 10,000 달톤의 PEG로 연결함으로써 두 단백질을 연결하고자 시도한 바 있으나 단순히 이작용성(Bifunctional) 단백질 제조가 목적이었다.
- <13> 킨스틀러 등(Kinstler et al., Pharmaceutical Research, 1995, 12(12): 1883-1888)에 의하면, 과립구 군체 자극인자(G-CSF) 아미노 말단과 인간 알부민에 존재하는 유리 -SH 그룹 사이를 PEG에 의해서 연결시키는데 성공하였으며, 제조된 융합 단백질은 쥐(rat)에서 체내 잔류시간이 4배 증가하였고, 백혈구 증식효과가 약 36시간까지 유지되었다. 그러나, 비록 안정성 증가 효과는 있었지만 예상보다 혈중 반감기가 짧아서 더 이상 개발되지 않았고, 알부민보다 뛰어난 안정성 효과를 줄 수 있는 리간드의 개발이 계속 요구되고 있다.

- <14> 국제 특허 공개 제WO 01/02017호에서는 적혈구 생성 촉진인자(EPO)의 혈중 반감기를 증가시키기 위해 PEG 링커를 사용하여 2단계로 PEG를 결합시켰다. 작은 PEG 링커를 EPO에 붙여 MAL-(Maleimide-) 그룹을 만들고(MAL-EPO), 한쪽 끝에 유리 -SH를 가진 분자량 40,000 달톤의 PEG를 MAL-EPO에 결합시켰다.
- <15> 상기의 결과들처럼 생리 활성 단백질의 생체 내 안정성을 높이는 방법으로 혈중 안정성이 높은 단백질을 직접 결합시키려는 연구도 진행된 바 있으나 비특이적 반응으로 인해 결합 부위의 선택적 반응에 실패하였거나 알부민의 사용 시처럼 기대한 만큼의 안정성을 증가시키지 못하였다.
- <16> 한편, 링커를 사용하여 합성하는 방법 외에 유전자 조작을 통해 직접 융합 단백질을 만드는 방법은 이미 많이 보고된 바 있다.
- <17> 국내 특허 공개 제2003-009464호에서는 인터페론 알파의 카르복실 말단과 IgG 불변부(Fc)의 아미노 말단을 연결시킨 융합 단백질을 포유동물 세포에서 발현시켰다. 발현된 인터페론 알파 융합 단백질은 인터페론 알파 단독에 비해 마우스에서 보다 긴 혈중 반감기(약 19시간)를 나타내었으며, 이는 부분적으로 더 큰 분자 크기에서 기인한 것으로 보인다.
- <18> 휴먼 게놈 사이언스(Human genome science)사에서는, 인터페론 알파의 아미노 말단과 HSA 카르복실 말단이 연결된 융합 단백질(제품명: Albuferon)을 효모에서 발현하였으며 현재 임상시험 중에 있다. 인터페론 알파의 반감기는 3시간에서 93시간으로 증가하였지만, 생체 활성도는 5% 미만으로 매우 낮았다(Osborn 등, J Pharm Exp Ther, 2002, 303(2)540-548).

- <19> 국내 특허 제249572호에서는 Ig G 중쇄 불변부(Fc)의 아미노 말단에 IL4 수용체, IL7 수용체, GCSF 수용체, EPO 수용체 등의 다양한 단백질의 카르복실 말단을 연결시킨 융합 단백질을 포유동물 세포로부터 제조하였다.
- <20> 그러나, 유전자 조작방법에 의한 융합 단백질 생산방법으로는 동물세포 배양을 통해 분자량이 큰 면역글로불린과의 융합 단백질을 발현시키기 어렵다. 또한, 생산된 융합 단백질은 당쇄화가 천연형과 완전히 동일하지는 않고, 융합부위 단백질 서열은 인체에 존재하지 않는 단백질 서열이므로 장기 투여 시 면역반응 유발가능성도 있으며, 적합한 발현 시스템을 확립하기 어렵다는 점 등 여러 가지 단점을 가지고 있다.
- <21> 이에, 본 발명자들은 생리 활성 단백질의 혈중 반감기를 획기적으로 증가시키고 생리 활성을 개선시키면서도 면역 반응 유발의 위험이 없는 융합 단백질을 개발하기 위해 연구를 계속한 결과, 수용성 중합체를 링커로 사용하여 과량 투여시에도 체내 축적이 염려되지 않는 천연형 고분자 단백질인 면역글로불린을 생리 활성 폴리펩티드에 결합시키면 이러한 효과를 모두 달성할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <22> 본 발명의 목적은 생리 활성 폴리펩티드의 혈중 반감기를 증가시키고 생리 활성을 개선시키면서도 면역 반응 유발의 위험이 없는, 생리 활성 폴리펩티드의 융합 단백질을 제공하는 것이다.
- <23> 본 발명의 다른 목적은 상기 융합 단백질의 화학적 제조 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <24> 상기 목적에 따라 본 발명은 생리 활성 폴리펩티드, 링커로서 양쪽에 반응기를 가진 수용성 중합체 및 면역글로불린으로 구성되며, 수용성 중합체에 의해서 공유결합으로 연결된 융합 단백질을 제공한다.
- <25> 또한, 본 발명은 생리 활성 폴리펩티드, 링커로서 양쪽에 반응기를 가진 수용성 중합체 및 면역글로불린을 화학적으로 결합시키는 것을 특징으로 하는 상기 융합 단백질의 제조 방법을 제공한다.
- <26> 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- <27> 본 발명에서 생리 활성 폴리펩티드로는 혈중 반감기를 증가시킬 필요가 있는 것이면 어느 것이나 특별한 제한이 없이 사용할 수 있으며, 인간의 질병을 치료 또는 예방할 목적으로 사용되는 인간 성장 호르몬(hGH), 인터페론(IFN), 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), 적혈구 생성 촉진인자(EPO), 인슐린, 인터루킨, 대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 및 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 등을 예시할 수 있으나 여기에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 사용되는 생리 활성 폴리펩티드는 천연형이거나, 천연형과 동등한 활성을 가지며 하나 이상의 아미노산 위치에서 돌연변이가 일어난 변이체일 수 있다. 그러한 변이체로서는 천연형 G-CSF의 17번째 아미노산이 세린으로 치환된 변이체(¹⁷S-G-CSF; 국내 특허 제356140호)를 예시할 수 있다.

- <28> 본 발명의 융합 단백질에서 생리 활성 단백질의 혈중 반감기를 증가시키기 위한 리간드 단백질은 인간 혈 중에서 단백질 반감기가 100시간 이상인 단백질로서, 특히 면역글로불린G(IgG)가 바람직하다.
- <29> 면역글로불린은 인간 혈액에서 정제한 천연형 및 유전공학적으로 생산된 재조합 단백질 중 어느 것이나 사용할 수 있으며, IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 중 어느 하나 또는 이들의 혼합물로서 사용할 수 있다. 또한, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4와 같은 서브타입 및 이들의 혼합물로도 역시 사용할 수 있고, 면역글로불린 서브타입의 종류에 따라 혈중 안정성의 증가 정도가 달라진다. IgG1, IgG2 및 IgG4는 유사한 혈중 반감기를 가진다고 알려져 있으며, IgG3는 이들보다 짧은 반감기를 나타낸다.
- <30> 면역글로불린 IgG의 혈중 안정성에 관여하는 부위는 주로 카타볼릭 영역(catabolic region)으로 알려져 있으며 아미노산 서열 252 내지 256, 308 내지 312 및 433 내지 436 번 영역이 안정성에 중요하다고 알려져 있다(미국특허 제 6,277,375 호). 또한 이러한 영역의 아미노산을 치환하여 줌으로써 면역글로불린의 안정성을 증가시킬 수 있다는 보고도 있다. 본 발명의 면역글로불린은 이러한 카타볼릭 영역의 일부에서 하나 이상의 아미노산 위치에서 돌연변이가 발생한 변이체일 수도 있다.
- <31> 본 발명의 융합 단백질은 면역 글로불린으로 인해 이량체를 형성할 수 있어 융합 단백질에 포함된 생리 활성 폴리펩티드가 천연형보다 높은 안정성 및 활성을 나타낼 수 있다.
- <32> 본 발명의 융합 단백질에서 생리 활성 폴리펩티드와 면역글로불린을 연결하는 링커로서 사용되는 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 단독 중합체, 폴리프로필렌 글리콜 단독 중합체, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올,

폴리 비닐 알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸 에테르 및 이들의 유도체일 수 있으며, 분자량이 1,000 내지 100,000 달톤인 것을 사용할 수 있고, 바람직하게는 1,000에서 20,000 달톤의 중합체를 사용할 수 있다.

<33> 또한, 상기 수용성 중합체는 융합단백질의 안정성 증가에 기여할 뿐만 아니라, 생리 활성 폴리펩티드와 면역글로불린을 연결시켜주는 가교로서의 역할과 단백질의 용해도나 pH에 따른 안정성 증가 등 물리화학적 특성을 안정화시켜주는 역할을 하므로, 이러한 점을 이용하여 수용성 중합체의 크기 등을 적절히 조절하면 최적의 반감기 및 약리 효과를 얻을 수 있다.

<34> 이러한 수용성 중합체는 기존의 화학적 링커와는 달리 면역반응 유발을 최소화할 수 있어서 더욱 안전하다.

<35> 상기 수용성 중합체는 반응 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 말레이미드 (maleimide) 그룹 또는 석시나미드(succinamide) 유도체를 양쪽 말단에 가지거나, 한쪽 말단에는 말레이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에는 알데히드 또는 프로피온 알데히드 그룹을 가질 수 있다. 상기 석시나미드 유도체로는 석시니미딜 프로피오네이트, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 바람직하다.

<36> 상기 수용성 중합체의 양쪽 말단의 반응성 그룹들은 생리 활성 폴리펩티드와 면역글로불린의 각 아미노 말단, 라이신의 아미노 잔기, 히스티딘의 아미노 잔기 또는 유리시스테인 잔기에 특이적으로 결합하여 단백질들을 서로 연결한다.

<37> 예를 들어, 반응 알데히드 그룹은 모든 단백질의 아미노 말단에만 결합하기 때문에 특이적 결합이 가능하게 된다. 또한 아미노 말단을 소유한 모든 단백질에 사용할 수 있

는 장점이 있다. 알데히드 결합기(linking group)에 의한 환원성 알킬화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합을 갖는 동일한 중합체/단백질 결합체보다 훨씬 더 안정하다는 것도 보고되어 있다(한국 특허 제261030호).

<38> 본 발명의 융합 단백질에서 생리 활성 폴리펩티드와 면역글로불린의 물비는 1:1 내지 10:1 일 수 있고, 바람직하게는 1:1 내지 4:1인 것이 바람직하다.

<39> 본 발명의 융합 단백질은 생리 활성 폴리펩티드에 커플링된 면역글로불린의 생체 안정성 효과를 직접적으로 받게 되어 생체내 반감기가 증가하며, 반감기 증가 정도와 융합된 단백질 또는 중합체의 분자량 사이에는 상관관계가 있기 때문에, 기존의 기술과 같이 Fc 부분만을 융합시킨 경우보다 분자량이 큰 면역글로불린과 융합시킨 경우 더 높은 혈중 안정성을 기대할 수 있다. 예를 들어, 인간 성장호르몬을 분자량 40,000 달톤의 폴리에틸렌 글리콜과 융합시킨 경우 혈중 반감기는 7배 정도 증가하는 반면, 면역글로불린과 융합시킨 경우에는 혈중 반감기가 약 13배 정도로 획기적으로 증가하므로 커플링된 리간드의 크기에 비례해서 혈중 반감기가 증가하는 것을 알 수 있다. 뿐만 아니라 융합 단백질의 활성도 기존 폴리에틸렌 글리콜 융합체보다 2배 이상 증가한다. 그러므로, 현재 천연형 인간성장호르몬의 경우 매일 주사해야 하는 불편함이 있는데 본 발명과 같이 면역글로불린과 융합시킬 경우 지속형 제형으로 활용될 수 있다. 또한, 동일한 구조의 융합 단백질도 거기에 포함된 생리 활성 단백질에 따라 고유한 혈중 반감기의 증가 현상을 나타낸다. 예를 들면, 인간 성장호르몬보다 혈중 반감기가 긴 인터페론 알파의 경우, 융합단백질 제조시 상대적으로 더욱 증가한 반감기를 보여준다. 그러므로, 일반적으로 천연형 인터페론의 경우 2일 제형으로 사용되고 있지만, 면역글로불린과 융합시키면 기

존의 PEG 수식형 인터페론보다도 훨씬 더 긴 제형으로 사용할 수 있을 것으로 기대하고 있다.

<40> 한편, 본 발명의 융합 단백질은 생리 활성 폴리펩티드를 수용성 중합체와 반응시킨 후 생성된 반응물을 인간 면역글로불린과 커플링 반응시켜 제조하거나, 인간 면역글로불린을 수용성 중합체와 반응시킨 후 생성된 반응물을 생리 활성 폴리펩티드와 커플링 반응시킴으로써 제조할 수 있다.

<41> 구체적으로, 본 발명의 한 가지 제조 방법은 (a) 활성화된 수용성 중합체를 생리 활성 폴리펩티드의 아미노 말단, 유리 시스테인 잔기, 히스티딘의 아미노 잔기 또는 라이신의 아미노 잔기에 선택적으로 반응시키는 단계, (b) 반응 혼합물로부터 수용성 중합체와 결합된 생리 활성 폴리펩티드를 분리하는 단계, (c) 수용성 중합체와 결합된 생리 활성 폴리펩티드를 인간 면역글로불린과 커플링 반응시키는 단계, 및 (d) 커플링된 융합 단백질을 분리하는 단계를 포함한다.

<42> 상기 방법의 단계 (a)에서 반응성을 최대화하고 이량체 등과 같은 부산물의 생성을 최소화하기 위한 생리활성 단백질:수용성 중합체의 반응 몰비는 1:0.5 내지 1: 20의 범위일 수 있고, 1:2.5 내지 1:5가 바람직하다. 또한, 반응은 필요에 따라 환원제의 존재 하에 저온, 예를 들어 2 내지 10℃에서 수행하는 것이 바람직하다. 이때 사용가능한 환원제로는 나트륨 시아노 보로하이드라이드(NaCNBH_3), 수소화붕소나트륨, 디메틸아민 붕산염, 티메틸아민 붕산염, 피리딘 붕산염 등을 예시할 수 있다.

<43> 상기 단계 (b)에서 반응 혼합물로부터 수용성 중합체와 결합된 생리 활성 폴리펩티드를 분리하기 위해서는 생성된 결합체의 분자량, 전하량 등의 특성을 고려하여 단백질의 분리에 사용되는 통상의 방법들을 필요에 따라 적절히 조합하여 사용할 수 있다. 예

를 들어, 생성된 결합체 단백질의 크기를 고려하여 크기 배제(size exclusion) 크로마토그래피를 실시할 수 있다.

- <44> 상기 단계 (c)에서 반응성을 최대화하고 이량체 등과 같은 부산물의 생성을 최소화하기 위한 인간 성장호르몬-수용성 중합체 결합체:면역글로불린의 반응 물비는 1:0.25 내지 1:20의 범위일 수 있고, 1:1 내지 1:4가 바람직하며, 특히 1:2가 가장 바람직하다.
- <45> 이 단계에서 커플링 반응 정도는 수용성 중합체의 양 말단에 존재하는 반응 그룹의 반응성에 의존한다. 예를 들어, 반응 알데히드 그룹을 갖는 수용성 중합체를 사용하여 상기 방법을 실시하는 경우, (a) 단계에서 생리활성 단백질의 아미노 말단에 수용성 중합체를 수식한 이후에 반응하지 않은 다른 한쪽 끝에 있는 알데히드 반응기의 반응성을 유지하는 것이 매우 중요하다. 알데히드 반응기는 용액 상태에서 오랜 시간 방치되면 산화되어 사용할 수 없기 때문에, 최대한 빠른 시간 안에 수식된 단백질을 정제하고, 비교적 환원 조건에서 정제하면 이러한 문제점을 극복할 수 있다.
- <46> 또한, 화학적 커플링 반응 시에는 단백질 간에 발생하는 구조적 방해(steric hinderance) 때문에 낮은 반응성을 보이는데, 상기 수용성 중합체를 링커로 사용하면 수용성 중합체가 단백질과 리간드 사이의 간격을 넓히는 기능을 하므로 이러한 문제를 해결할 수 있다:
- <47> 상기 단계 (d)에서는 생성된 최종 융합 단백질의 분자량, 전하량 등의 특성을 고려하여 단백질의 분리에 사용되는 통상의 방법들을 필요에 따라 적절히 조합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 생성된 결합체 단백질의 크기를 고려하여 크기 배제 크로마토그래피를 실시할 수 있다. 또한, 보다 순수하게 정제하기 위해 이온 교환 크로마토그래피 등을 추가로 실시할 수 있다.

<48> 본 발명의 융합 단백질을 제조하기 위한 다른 방법은, (a) 활성화된 수용성 중합체를 인간 면역글로불린의 아미노 말단, 유리 시스테인 잔기, 히스티딘의 아미노 잔기 또는 라이신의 아미노 잔기에 선택적으로 반응시키는 단계, (b) 반응 혼합물로부터 수용성 중합체와 결합된 면역글로불린을 분리하는 단계, (c) 수용성 중합체와 결합된 면역글로불린을 생리 활성 폴리펩티드와 커플링 반응시키는 단계, 및 (d) 커플링된 융합 단백질을 분리하는 단계를 포함한다.

<49> 이 방법은 첫 번째 방법과 반응 순서만 다른 것으로 반응 조건 등은 상기에서 언급한 첫 번째 방법과 동일하다. 그러나, 예를 들어 3.4 kDa PEG와 같이 분자량이 작은 수용성 중합체가 링커로서 사용되는 경우, (a) 단계에서 제조된 면역글로불린과 수용성 중합체의 결합체는 면역글로불린 자체와 비교할 때 분자량 차이가 미미하므로, 상기 (b)의 분리 단계에서는 크기 배제 크로마토그래피 만으로 결합체를 충분히 정제할 수 없고, 이온 교환 크로마토그래피 등을 추가로 실시하여야 한다.

<50> 본 발명의 방법에서는 말단에 선택적 반응성을 가진 PEG 링커와 같은 수용성 중합체 링커를 이용하여 혈중 안정성이 큰 천연형 인간 면역글로불린을 리간드로서 생리 활성 폴리펩티드에 화학적인 방법으로 커플링시켜 융합 단백질을 제조하므로, 화학적 링커를 사용해서 화학적인 방법으로 목적 단백질과 리간드의 융합 단백질을 제조하는 기존 방법의 문제점인 리간드와 단백질의 비선택적 결합, 반응 결과물의 불균질한 조성, 커플링에 사용된 화학적 링커에 의한 면역반응 등의 문제를 모두 해결하여, 면역 반응의 가능성을 최소화하고 링커의 길이에 따른 유연성(Flexibility)으로 생리활성 단백질의 활성을 최대한 유지할 수 있게 함으로써 혈중 안정성과 역가 감소 방지라는 두 가지 효과를 동시에 얻을 수 있다.

<51> 아울러, 본 발명의 방법은 유전자 재조합에 의한 융합단백질 제조 방법에서 생성되는 융합부위 단백질 서열에 의한 면역반응 가능성을 배제하여 인체 적합성이 최대화된 융합단백질을 제조할 수 있으며, 보다 간편하고 빠르게 다양한 종류의 융합 단백질을 생산할 수 있는 장점이 있다.

<52> 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 좀더 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

<53> 실시예 1: 인간 성장호르몬과 링커의 연결

<54> 인간 성장호르몬(hGH, 분자량 22 kDa)에 다른 단백질의 중합을 위한 링커를 연결하기 위하여, 양쪽 말단에 알데히드 화학적 반응기를 가진 폴리에틸렌글리콜(PEG)인 ALD-PEG-ALD(분자량 3.4 kDa)(Shearwater Inc. 미국)를 인간 성장호르몬이 5 mg/ml 농도로 용해된 100 mM 인산염 완충용액에 인간 성장 호르몬:링커 PEG의 몰비가 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10, 1:20이 되도록 첨가하고, 환원제인 나트륨 시아노보로하이드라이드(NaCNBH_3)를 20 mM이 되도록 넣었다. 4°C에서 천천히 교반하면서 3시간 동안 반응을 진행시켰다. 인간 성장호르몬의 아미노 말단 부위에 선택적으로 링커를 연결하고, 링커와 인간 성장호르몬이 1:1로 결합한 결합체를 얻기 위하여 반응혼합물을 가지고 슈퍼덱스(Superdex^R, Pharmacia, 독일) 크기 배제(size exclusion) 크로마토그래피를 실시하였다. 용출액으로 10 mM 칼륨-포스페이트 완충액(pH 6.0)을 사용하여 인간

성장호르몬-링커 PEG-ALD를 정제하였고, 링커와 결합하지 않은 인간 성장호르몬, 미반응 링커 및 2개의 인간 성장호르몬이 링커와 연결된 다이머 부산물을 제거할 수 있었다. 반응성이 가장 좋고 다이머 등과 같은 부산물이 적은 인간 성장호르몬:링커PEG의 최적 반응 물비는 1: 2.5 ~ 1:5 임이 확인되었다. 정제된 인간 성장호르몬-링커 PEG-ALD는 약 5 mg/ml이 되도록 농축하였다.

<55> 실시예 2: 인간 성장호르몬과 면역글로불린의 융합체 제조

<56> 실시예 1에서 정제된 인간 성장호르몬-링커 PEG-ALD에 면역글로불린을 융합하기 위하여 10 mM 인산염 완충용액에 용해된 면역글로불린 G(Immunoglobulin G : IgG, 분자량 150 kDa)(녹십자, 한국)를 사용하여 융합반응을 하였다. 인간 성장호르몬-링커 PEG-ALD:면역글로불린의 물비를 1:1, 1:2, 1:4, 1:8이 되도록 하여 융합 반응을 하였다. 반응액을 100 mM 인산염 완충용액 상태로 만들었고, 환원제로서 나트륨시아노보로하이드라이드(NaCNBH_3)를 최종 농도가 20 mM이 되도록 넣어주었다. 반응 혼합물을 4℃에서 20 시간 동안 천천히 교반하면서 반응을 진행시켰다. 반응성이 가장 좋고 다이머 등과 같은 부산물이 적은 인간 성장호르몬-링커PEG-ALD:면역글로불린의 최적 물비는 1:2임이 확인되었다.

<57> 융합 반응 후 미반응 물질 및 부산물을 제거하고 생성된 인간 성장호르몬-

PEG 링커-면역글로불린 융합 단백질을 정제하기 위하여 슈퍼덱스 크기 배제 크로마토그래피를 진행하였다. 각 반응 혼합물을 농축 후 10 mM 아세트산 나트륨 완충용액을 이용하여, 유속 2.5 ml/분으로 컬럼에 통과시켰다. 인간 성장호르몬-PEG 링커-면역글로불린 융합 단백질을 얻을 수 있었고, 융합되지 않은 면역글로불린 및 미반응 물질을 제거할 수 있었다. 얻어진 인간 성장호르몬-PEG 링커-면역글로불린 융합 단백질 분획에는 불순물로서 소량의 미반응 면역글로불린 및 인간 성장호르몬 이량체가 섞여 있어서 이의 제거를 위해 추가로 양이온 교환 수지 크로마토그래피를 진행하였다. 인간 성장호르몬-PEG 링커-면역글로불린 융합 단백질 분획을 10 mM 아세트산 나트륨(pH 4.5)으로 평형화시킨 컬럼(SP5PW, Waters, 미국)에 넣고 1 M 염화나트륨(NaCl)을 포함한 10 mM 아세트산 나트륨(pH 4.5) 완충액을 직선 농도구배(염화나트륨 농도 0 M → 0.5 M) 방법으로 흘려 추가 정제를 실시하여 인간 성장호르몬-PEG 링커-면역글로불린 융합 단백질을 순수하게 획득하였다.

<58> 실시예 3: 인터페론 알파와 면역글로불린의 융합체 제조

<59> 인간 성장 호르몬 대신에 인터페론 알파 2b(IFN α 2b, 분자량 20 kDa)를 사용하고, IFN α 2b와 ALD-PEG-ALD(분자량 3.4 kDa)의 몰비를 1:5로 하는 것을 제외하고는 실시예 1에서와 동일한 방법으로 실시하여 IFN α -링커 PEG-ALD를 제조 및 정제하였다.

<60> 얻어진 IFN-α -링커 PEG-ALD를 이용하여 실시예 2와 같은 방법으로 IFN-α -PEG 링커-면역글로불린 융합 단백질을 순수하게 획득하였다.

<61> 실시예 4: 인간 과립구 콜로니 자극인자와 면역글로불린의 융합체 제조

<62> 인간 성장 호르몬 대신에 인간 과립구 콜로니 자극인자(G-CSF)를 사용하고, G-CSF와 ALD-PEG-ALD(분자량 3.4 kDa)의 몰비를 1:5로 하는 것을 제외하고는 실시예 1에서와 동일한 방법으로 실시하여 G-CSF-링커 PEG-ALD를 제조 및 정제하였다.

<63> 얻어진 G-CSF-링커 PEG-ALD를 이용하여 실시예 2와 같은 방법으로 G-CSF-PEG 링커-면역글로불린 융합 단백질을 순수하게 획득하였다.

<64> 또한, 천연형 G-CSF의 17번째 아미노산이 세린으로 치환된 변이체(^{17}S -G-CSF; 국내 특허 제356140호)를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 G-CSF 변이체-PEG 링커-면역글로불린 융합 단백질을 순수하게 획득하였다.

<65> 실시예 5: 인간 적혈구 생성 촉진인자와 면역글로불린의 융합체 제조

<66> 인간 성장 호르몬 대신에 인간 적혈구 생성 촉진인자(Erythropoietin, EPO)를 사용하고, EPO와 ALD-PEG-ALD(분자량 3.4 kDa)의 몰비를 1:5로 하는 것을 제외하고는 실시예 1에서와 동일한 방법으로 실시하여 EPO-링커 PEG-ALD를 제조 및 정제하였다.

<67> 얻어진 EPO-링커 PEG-ALD를 이용하여 실시예 2와 같은 방법으로 EPO-PEG 링커-면역글로불린 융합 단백질을 순수하게 획득하였다.

<68> 실시예 6: 반응 그룹이 다른 PEG를 이용한 커플링

- <69> 링커로서 양쪽 말단의 반응 그룹이 모두 SPA(succinimidyl propionate)-인 PEG를 사용해서 인간 성장호르몬-링커 PEG-면역글로불린 융합 단백질을 다음과 같이 제조하였다.
- <70> 인간 성장호르몬 10 mg에 다른 단백질의 중합을 위한 링커를 연결하기 위하여 인간 성장호르몬이 용해된 100 mM 인산염 완충용액에 양쪽 말단에 SPA 화학적 반응기를 가진 폴리에틸렌글리콜(PEG)인 SPA-PEG-SPA(분자량 3.4 kDa)(Shearwater Inc. 미국)를 인간 성장호르몬:링커 PEG의 물비가 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10, 1:20이 되도록 정량하여 첨가시키고, 상온에서 천천히 교반하면서 2시간동안 반응시켰다. 인간 성장호르몬의 라이신 잔기의 아미노 그룹 부위에 선택적으로 링커를 연결하고, 링커와 인간 성장호르몬이 1:1로 결합한 결합체를 얻기 위하여, 반응 혼합물을 가지고 슈퍼텍스 크기 배제 크로마토그래피를 실시하였다. 용출액으로 10 mM 칼륨-포스페이트 완충액(pH 6.0)을 사용하여 인간 성장호르몬-링커 PEG-SPA를 정제하였고, 링커와 결합하지 않은 인간 성장호르몬, 미반응한 링커 및 2개의 인간 성장호르몬이 링커와 연결된 다이머 부산물을 제거하였다. 반응성이 가장 좋고 다이머 등과 같은 부산물이 적은 인간 성장호르몬:링커 PEG의 최적 반응 물비는 1:2.5 ~ 1:5 임이 확인되었다. 면역글로불린을 융합하기 위하여 정제된 인간 성장호르몬-링커 PEG-SPA를 약 5 mg/ml이 되도록 농축한 후, 실시예 2와 동일한 방법으로 인간 성장호르몬-링커 PEG-면역글로불린을 제조하였다.
- <71> 또한, 링커로서 양쪽 말단의 반응 그룹이 모두 NHS(N-hydroxysuccinimidyl)-인 PEG(NHS-PEG-NHS, Shearwater Inc, 미국)를 사용해서 인간 성장호르몬-링커 PEG-면역글로불린이 얻어짐을 확인하였다.

<72> 실시예 7: 분자량이 다른 PEG를 이용한 커플링

<73> 분자량이 10,000 달톤이고, 양쪽 말단에 알데히드 화학적 반응기를 가진 폴리에틸렌글리콜(PEG)인 ALD-PEG-ALD(Shearwater Inc. 미국)를 사용하여 실시예 1과 동일한 방법으로 인간 성장호르몬-링커 PEG-ALD를 제조 및 정제하였으며, 반응성이 가장 좋고 다이며 등과 같은 부산물이 적은 인간 성장호르몬:링커 PEG의 최적 몰비는 1: 2.5 ~ 1:5 임이 확인되었다. 정제된 인간 성장호르몬-링커 PEG-ALD를 약 5 mg/ml이 되도록 농축한 후, 이를 이용하여 실시예 2와 동일한 방법으로 인간 성장호르몬-링커 PEG-면역글로불린 융합 단백질을 제조 및 정제하였다.

<74> 실시예 8: 융합 단백질 확인 및 정량 방법

<75> (1) 융합 단백질의 확인

<76> 상기 실시예에서 제조한 융합 단백질의 확인은 4-20 % 기울기 겔을 사용한 SDS-PAGE 및 ELISA(R&D system, 미국) 방법으로 확인하였다.

<77> hGH, hGH-링커 PEG(실시예 1), IFN, IFN-링커 PEG(실시예 3)에 DTT(Dithiothreitol)를 각각 50 mM의 양으로 첨가한 시료들을 이용하여 SDS-PAGE를 실시하였고, IgG, hGH-PEG-IgG(실시예 2) 및 IFN-PEG-IgG(실시예 3)은 DTT 없이 전개시켰다.

<78> 각 단백질의 SDS-PAGE 결과를 도 1 및 2에 나타내었다. 도 1은 커플링 반응 후 생성된 hGH-PEG-IgG 융합 단백질을 확인하기 위한 SDS-PAGE 결과이고, 도 2는 커플링 반응 후 생성된 IFN-PEG-IgG 융합 단백질을 확인하기 위한 SDS-PAGE 결과이다. 왼쪽에 나열한 숫자는 분자량 마커로서 단위는 kDa 이다.

<79> 도 1 및 2에서 볼 수 있는 바와 같이, hGH의 경우 겔보기 분자량은 IgG 융합 단백질이 약 170 kDa으로 나타났다.

<80> 그러나, IgG 융합 단백질의 경우, 분자량 차이를 SDS-PAGE 상에서 구별하기 어렵기 때문에, hGH-PEG-IgG(실시예 2) 및 IgG에 DTT를 각각 처리해서 환원시켜 겔새, 중쇄 그리고 중쇄 이량체로 분리하였고, 각각이 커플링된 상태를 SDS-PAGE 상에서 확인하였다(도 3).

<81> IgG에 DTT를 처리하면, 작은 분자량 순서로 겔새, 중쇄, 중쇄 이량체가 나누어지고, hGH 커플링된 IgG는 세 종류의 폴리펩티드에 각각 hGH-PEG(3.4 kDa) 결합체의 크기만큼 증가된 위치에 밴드가 보였다. hGH 커플링된 겔새는 중쇄보다 약간 작은 위치에, hGH 커플링된 중쇄는 중쇄 이량체보다 약간 작은 위치에, 마지막으로 hGH 커플링된 중쇄 이량체는 약 130 kDa 위치에 밴드로 확인할 수 있었다. 그러므로 겔새와 중쇄 사이에 커플링 선택성은 없었고 IgG 한 분자당 한 분자의 hGH가 결합한 것으로 나타났다. 커플링 반응에서 hGH-PEG:IgG 의 물비를 1:1 미만으로 조절하면 IgG 하나에 2개의 hGH가 커플링될 수 있기 때문에 이량체 형성에 의한 활성 증가 효과를 기대할 수도 있다.

<82> (2) 융합단백질의 정량

<83> 실시예에서 제조한 각각의 융합 단백질의 양은 크기 배제 크로마토그래피(컬럼: Superdex, 용출액: 10 mM 칼륨-포스페이트 완충액(pH 6.0)) 상에서 피크면적을 대조구와 비교하여 환산하는 방법으로 계산하였다. 이미 정량되어 있는 hGH, IFN, G-CSF, 17 S-G-CSF, EPO 및 IgG로 각각 크기 배제 크로마토그래피를 실시한 후 농도와 피크면적 간의 환산계수를 측정하였다. 각 융합 단백질 일정량을 사용하여 동일한 크기 배제 크로마

토그래피를 실시하고, 여기서 얻어진 피크면적에서 면역글로불린에 해당하는 피크면적을 뺀 값을 각 융합 단백질에 존재하는 생리활성 단백질의 정량값으로 하였다.

<84> 크로마토그래피 방법 이외에 ELISA(R&D system, 미국) 방법을 병행하였다. IgG에 의해 융합되면 생리활성 단백질 항체에 의해 정량할 때, 실제값보다 적게 정량된다. hGH-PEG-IgG의 경우 대략 실제 값의 약 30 % 정도 정량된다.

<85> (3) 융합 단백질의 순도

<86> 크기 배제 크로마토그래피를 실시한 후 280 nm에서 흡광했을 때, hGH-PEG-IgG(실시예 2), IFN-PEG-IgG(실시예 3) 및 G-CSF(또는 ^{17}S -G-CSF)-PEG-IgG(실시예 4)는 분자량 170,000-180,000 달톤인 물질의 체류시간대에서 단일피크를 보였다. EPO-PEG-IgG(실시예 5)는 분자량 200,000 달톤에 해당하는 부근에서 단일피크로 확인되었다.

<87> 참고예: PEG-인간 성장 호르몬 결합체의 제조

<88> 100 mM 인산칼륨 완충 용액(pH 6.0)에 인간 성장 호르몬 5 mg을 넣어 최종 부피 5 ml가 되도록 준비한 후, PEG의 분자량이 40 kDa인 활성화된 메톡시-PEG-알데히드 (Shearwater사, 미국)를 인간 성장 호르몬:메톡시-PEG-알데히드의 몰비가 1:4가 되도록 상기 용액에 넣었다. 상기 반응 용액에 환원제인 NaCNBH_3 (Sigma사, 미국)를 최종 20 mM 이 되도록 첨가한 후, 4℃에서 18시간 동안 서서히 교반시키면서 반응시켰다. 인간 성장 호르몬에 반응하지 않은 PEG를 불활성화시키기 위해 에탄올아민을 최종농도가 50 mM이 되도록 넣었다.

<89> 반응하지 않은 PEG를 분리하기 위해 세파텍스 G-25 컬럼(Pharmacia사)을 이용하였다. 먼저 2 CV(column volume)의 10 mM Tris-HCl(pH 7.5)의 완충 용액으로 컬럼을 평형화시킨 후 반응 혼합물을 점적하였다. 파장 260 nm의 자외부 흡광계로 검출하며 동일한 완충 용액으로 용출하면 크기가 더 큰 PEG로 수식된 인간 성장 호르몬이 먼저 용출되어 나오고 반응하지 않은 PEG는 후에 용출되므로 이를 제거하였다.

<90> 상기에서 얻은 용출 용액으로부터 PEG로 수식된 인간 성장 호르몬을 더욱 순수하게 분리, 정제하기 위해 다음을 수행하였다. 3 ml의 폴리왁스 엘피(PolyWAX LP, Polywax Inc., 미국) 컬럼을 10 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충 용액으로 평형화시켰다. PEG화된 반응 혼합물을 1ml/분의 유속으로 컬럼상에 부하시킨 후, 15 ml의 평형 완충 용액으로 세척하였다. 30 ml의 1 M NaCl 완충 용액으로 30분 동안 0에서 100 %까지의 염 농도 구배 방법을 이용하여, 트리-, 디-, 모노-PEG-인간 성장 호르몬 순서로 용출시켰다.

<91> 더욱 순수한 모노-PEG 인간 성장 호르몬을 분리하기 위해 상기에서 수득한 모노-PEG-인간 성장 호르몬 결합체 용출 분획을 가지고 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다. 10 mM 인산나트륨 완충 용액(pH 7.0)으로 평형화시킨 슈퍼텍스 200(Superdex 200, Pharmacia사)에 상기 용출액을 농축하여 점적하였으며, 동일한 완충 용액으로 용출하였다. 유속은 1 ml/분으로 흘려주었다. 트리-, 디-PEG-인간 성장 호르몬은 모노-PEG-인간 성장 호르몬보다 용출 시간이 상대적으로 빠르므로 이를 제거하여 순수한 모노-PEG-인간 성장 호르몬만을 수득하였다.

<92> 시험예 1: 약물동력학

<93> 각 군당 5마리의 SD 랫트(Rat)에게 천연형 생리활성 단백질(대조군)과 상기 실시예에서 제조한 각 융합 단백질(시험군)을 100 ug/kg이 되도록 피하주사한 후, 대조군은 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 30 및 48시간 후에 채혈하였고, 시험군은 주사 후 1, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96 및 120시간 후에 채혈하였다. 혈액시료는 헤파린을 함유하는 튜브에 모아서 응고를 방지하였고, 에펜도르프 고속 마이크로 원심분리기에서 5분간 원심분리하여 세포를 제거하였다. 혈장 내 융합 단백질 양은 각 생리활성 단백질 항체를 이용한 ELISA 방법으로 측정하였다.

<94> 그 결과, 각 천연형 단백질과 융합 단백질의 혈중 반감기는 하기 표 1과 같았다.

<95> 【표 1】

단백질	혈중 반감기(시간)		
	천연형 단백질	IgG 융합 단백질	
		실시예	반감기
hGH	1.1	2	13.8
IFN	1.7	3	> 50
G-CSF	2.8	4	12.1
¹⁷ Ser-G-CSF	2.9	4	13.7
EPO	3.2	5	17.2

<96> 상기 표 1에서 볼 수 있는 바와 같이, IgG가 융합된 단백질들은 천연형 단백질들에 비해 4배 이상 증가한 혈중 반감기를 나타내었다.

<97> 한편, 도 4의 약물 동력학 그래프에서도 볼 수 있듯이, hGH-PEG-IgG 융합 단백질의 경우 혈중 반감기는 13.8시간으로서 천연형 hGH에 비해 약 13배 증가하였으며, 참고예에서 제조한 40 kDa 모노-PEG-hGH를 이용하여 상기와 동일한 실험을 반복했을 때의 반감기

인 7.7 시간보다 약 2배 정도 증가하였다. 즉, 커플링된 리간드가 PEG와 유사한 작용을 하며, 혈중 반감기 증가에 기여한다고 볼 수 있다.

<98> 한편, PEG의 분자량을 10,000 달톤으로 증가시킨 hGH-PEG-IgG 융합 단백질(실시에 7)을 사용하여 동일한 방법으로 반감기를 측정했을 때, 반감기는 14.7 시간으로서 분자량 3,400 달톤인 PEG를 사용한 융합단백질의 반감기인 13.8 시간보다 다소 증가하였다. 즉, PEG의 분자량 증가에 따라 혈중 반감기가 증가함을 알 수 있다. PEG 링커의 반응 그룹을 변화시킨 경우 겔보기 분자량과 혈중 반감기는 유사한 양상을 보였다.

<99> 시험예 2: 세포내 활성 측정

<100> (1) 인간 성장호르몬 융합단백질의 세포내 활성비교

<101> 인간 성장호르몬 융합단백질의 세포내 활성비교를 위하여 hGH-PEG-IgG(실시에 2) 및 40 kD 모노-PEG-hGH(참고예)의 세포내 활성을 비교 시험하였다.

<102> 세포내 활성도 측정은 인간 성장 호르몬 의존성 유사 분열을 하는 세포인 랫트 노드 림포마(Rat node lymphoma) 세포주인 Nb2 세포(European Collection of Cell Cultures(ECACC) #97041101)를 이용하여 시험관내 분석을 하였다.

<103> Nb2 세포를 배양액(Fisher`s medium)에 10 % 소 태아 혈청(FBS, fetal bovine serum), 0.075 % NaCO_3 , 0.05 mM 2-메르캅토에탄올 및 2 mM 글루타민을 첨가한 배지에서 배양한 후, 10 % 소 태아 혈청을 제외한 동일한 배지에서 24시간 동안 더 배양하였다. 배양액에서 배양된 세포의 수를 세어 약 20,000개의 세포를 96 웰 플레이트의 각 웰에 넣은 후, hGH-PEG-IgG(실시에 2) 및 40 kDa 모노-PEG-hGH(참고예), 대조군인 국제 표준

품(National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC), 천연형 인간 성장 호르몬(HM-hGH)을 각각 회석하여 농도별로 첨가한 후 48시간 동안 37℃, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이 후 세포의 성장 정도(각 well의 세포 수)를 측정하기 위해 세포 염색약(cell titer 96 Aqueous One Solution(promega사, 미국))을 각 웰에 25 μ l씩 넣은 후, 4시간 동안 배양하였다. 이 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 각 시료의 역가를 계산하고, 표 2에 나타내었다.

<104> 【표 2】

	농도(ng/ml)	비활성* (U/mg)	HM-hGH에 대한 상대적 활성 (%)
HM-hGH	100	2.71E+06	-
NIBSC	100	2.58E+06	95.2
40kDa 모노-PEG-hGH	100	0.206E+05	7.6
IgG-PEG-hGH	100	0.86E+06	31.7
비활성*=1/ED ₅₀ x 10 ⁶ (ED ₅₀ : 최대 세포 성장의 50 %를 나타내는 단백질의 양)			

<105> 표 2에서 볼 수 있듯이, 시험에 사용한 모든 시료는 인간 성장 호르몬 감수성 세포의 성장을 촉진시키는 것으로 보아 모두 활성이 있음을 알 수 있고, PEG에 의해 수식된 인간 성장 호르몬은 그 활성도가 수식되지 않은 것에 비하여 떨어짐을 확인할 수 있다. 수식된 PEG의 크기가 클수록 그 활성도가 점차 떨어짐은 알려져 있는데, 40 kDa의 PEG가 수식된 인간 성장호르몬의 경우 천연형 인간 성장 호르몬의 활성도의 약 7.6 %를 갖는 것으로 나타났다. 그러나 면역글로불린 융합체의 경우 상대적 활성도가 30 % 이상으로 획기적으로 높아짐을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로부터 혈중 반감기의 획기적 증가와 더불어 면역글로불린 융합체의 체내 약리 효과가 매우 뛰어날 것을 기대 할 수 있

다. 본 발명의 면역글로불린의 단백질 융합체의 경우 면역글로불린에 의한 혈중 안정성 증가와 함께 링커로 사용한 PEG 링커로 인해 형성된 공간적 여유에 의해 단백질의 활성이 증가한 것으로 보인다. 이러한 작용은 다른 단백질들의 면역글로불린 융합체에서도 비슷할 것으로 기대된다.

<106> (2) 인터페론 알파 융합단백질의 세포내 활성비교

<107> 인터페론 알파 융합단백질의 세포내 활성비교를 위하여 IFN-PEG-IgG(실시예 3) 및 40 kDa 모노-PEG-IFN의 항바이러스 활성을 수포성 구내염 바이러스로 포화시킨 마딘-다비 (Madin-Darby) 소 신장 세포 (MDBK, Madin Darby Bovine Kidney, ATCC CCL-22)를 사용하는 세포배양 생검으로 측정하였다. 이때, 폴리에틸렌 글리콜이 결합되지 않은 인터페론 알파 2b(NIBSC 인터페론)를 대조군으로 사용하였다. 40 kDa 모노-PEG-IFN은 참고예에서 hGH 대신 IFN을 사용하여 동일한 방법으로 제조하였다.

<108> MDBK 세포를 MEM(minimum essential medium: JBI)에 10 % FBS 및 1 % 페니실린 스트렙토마이신이 첨가된 배지에서 37℃, 5 % CO₂의 조건으로 배양하였다. 측정하고자 하는 시료와 표준물질(NIBSC 인터페론)을 일정 농도로 세포 배양 배지에 희석하여 96 웰 플레이트의 각 웰에 100 μ l씩 분주한 다음, 상기에서 배양된 세포를 플라스크에서 떼어 내어 시료가 분주되어 있는 플레이트에 100 μ l씩 가한 후, 37℃, 5 % CO₂ 조건에서 약 1 시간 가량 배양하였다. 1시간 후 바이러스 농도가 5 ~ 7 x 10³ PFU 가 되도록 조절된 VSV(Vesicular stomatitis virus)를 50 μ l씩 플레이트에 첨가시켜 주었다. 음성 대조군으로 시료 및 표준 물질을 넣지 않고 세포와 바이러스만을 넣은 웰을, 양성 대조군으로

바이러스 희석 용액을 넣지 않고 세포만 넣은 웰을 만들었고, 모든 시험군은 37℃, 5 % CO₂ 의 조건에서 약 16 ~ 20 시간 추가로 배양하였다.

<109> 배양액을 제거하고 살아있는 세포를 염색하기 위하여 뉴트랄 레드(neutral red) 용액 100 μ l씩을 첨가하여 준 뒤, 37℃, 5 % CO₂ 조건에서 2시간 동안 배양하였다. 상등액을 제거한 후 100 % 에탄올과 1 % 아세트산을 1:1로 섞어서 100 μ l씩 넣어주었다. 염색된 세포를 잘 흔들어서 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조군을 블랭크(blank)로 하고, 양성 대조군을 세포 성장 100 %로 간주하여 50 % 세포 성장 부분의 농도(ED₅₀)를 계산하였다.

<110> 【표 3】

	농도(ng/ml)	ED ₅₀ (IU/mg)	IFN에 대한 상대적 활성 (%)
IFN	100	4.24E+08	-
40kDa 모노-PEG-IFN	100	2.04E+07	4.8
IgG-PEG-IFN	100	4.75E+07	11.2

<111> 표 3에서 보는 바와 같이, PEG에 의해 수식된 인터페론은 그 활성도가 수식되지 않은 것에 비하여 떨어짐을 확인할 수 있다. 특히, 수식된 PEG의 크기가 클수록 혈중 안정성은 증가하지만 상대적으로 활성도가 점차 떨어짐을 알 수 있고, 40 kDa의 PEG가 수식된 경우 표준형 인터페론의 활성도의 약 4.8 %를 갖는 것으로 나타났다. 그러나 본 발명에서 제조한 면역글로불린-인터페론 융합체의 경우 40 kDa PEG 수식된 인터페론보다 상대적 활성도가 2배 이상 높은 11.2 %로 나타났으며, 이미 상기 표 1에서 혈중 안정성이 50시간 이상으로 획기적으로 높아진다는 것이 확인되었다. 이와 같은 결과로부터, 혈

중 반감기의 획기적 증가와 더불어 면역글로불린-인터페론 융합체의 체내 약리 약효가 매우 뛰어날 것으로 기대할 수 있다.

【발명의 효과】

<112> 본 발명의 융합 단백질은 생리 활성 폴리펩티드의 혈중 반감기를 증가시키고 생리 활성을 개선시키면서도 면역 반응 유발의 위험이 없으므로, 생리 활성 폴리펩티드의 활성을 유지하면서 투여 간격을 증가시킬 수 있는 장점이 있다.

<113> 또한, 본 발명의 화학적 제조 방법을 이용하면, 유전자 조작에 의한 융합 단백질 생산보다 간편하고 빠르게 다양한 종류의 융합 단백질을 제조할 수 있고, 위치 선택적 IgG 커플링으로 보다 증가된 혈중 반감기를 갖는 융합 단백질을 제조할 수 있는 장점이 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

생리 활성 폴리펩티드, 링커로서 양쪽에 반응기를 가진 수용성 중합체 및 면역글로불린으로 구성되며, 수용성 중합체에 의해서 공유결합으로 연결된 융합 단백질.

【청구항 2】

제1항에 있어서,

생리 활성 폴리펩티드는 인간 성장호르몬(hGH), 인터페론(IFN), 과립구 증식인자(G-CSF), 17번 시스테인이 세린으로 치환된 아미노산 서열을 갖는 과립구 증식인자 유도체 (17S-G-CSF 변이체), 적혈구 생성 촉진인자(EPO), 인슐린, 인터루킨, GM-CSF 및 종양괴사인자 수용체(TNFR)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

【청구항 3】

제1항에 있어서,

면역글로불린은 인간 혈액에서 정제한 천연형 단백질이거나 재조합 단백질인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

【청구항 4】

제3항에 있어서,

면역글로불린은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

【청구항 5】

제3항에 있어서,

면역글로불린은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

【청구항 6】

제3항에 있어서,

면역글로불린은 하나 이상의 아미노산 위치에서 돌연변이가 발생한 변이체인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

【청구항 7】

제1항에 있어서,

수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 단독 중합체, 폴리프로필렌 글리콜 단독 중합체, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리 비닐 알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸 에테르 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

【청구항 8】

제1항에 있어서,

수용성 중합체는 분자량이 1,000 내지 100,000 달톤인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

【청구항 9】

제1항 또는 제8항에 있어서,

수용성 중합체는 반응 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 말레이미드(maleimide) 그룹 및 석시나미드(succinamide) 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 그룹을 양쪽 말단에 갖는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

【청구항 10】

제9항에 있어서,

석시나미드 유도체는 석시나미딜 프로피오네이트, 석시나미딜 카르복시메틸 또는 석시나미딜 카보네이트인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

【청구항 11】

제1항 또는 제8항에 있어서,

수용성 중합체는 한쪽 말단에 말레이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에 알데히드 또는 프로피온 알데히드 그룹을 갖는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

【청구항 12】

제1항에 있어서,

생리 활성 폴리펩티드와 면역글로불린이 각각 아미노 말단, 라이신의 아미노 잔기, 히스티딘의 아미노 잔기 또는 유리 시스테인 잔기에서 수용성 중합체에 의해 연결된 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

【청구항 13】

제1항에 있어서,

생리 활성 폴리펩티드와 면역글로불린의 몰비가 1:1 내지 4:1인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

【청구항 14】

제1항에 있어서,

생리 활성 폴리펩티드는 천연형과 동등한 활성을 가지며 하나 이상의 아미노산 위치에서 돌연변이가 일어난 변이체인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

【청구항 15】

하기 단계를 포함하는 제1항의 융합 단백질의 제조 방법:

- (a) 활성화된 수용성 중합체를 생리 활성 폴리펩티드의 아미노 말단, 유리 시스테인 잔기, 히스티딘의 아미노 잔기 또는 라이신의 아미노 잔기에 선택적으로 반응시키는 단계,
- (b) 반응 혼합물로부터 수용성 중합체와 결합된 생리 활성 폴리펩티드를 분리하는 단계,
- (c) 수용성 중합체와 결합된 생리 활성 폴리펩티드를 면역글로불린과 커플링 반응시키는 단계, 및
- (d) 커플링된 융합 단백질을 분리하는 단계.

【청구항 16】

하기 단계를 포함하는 제1항의 융합 단백질의 제조 방법:

- (a) 활성화된 수용성 중합체를 면역글로불린의 아미노 말단, 유리 시스테인 잔기, 히스티딘의 아미노 잔기 또는 라이신의 아미노 잔기에 선택적으로 반응시키는 단계,
- (b) 반응 혼합물로부터 수용성 중합체와 결합된 면역글로불린을 분리하는 단계,
- (c) 수용성 중합체와 결합된 면역글로불린을 생리 활성 폴리펩티드와 커플링 반응시키는 단계, 및

(d) 커플링된 융합 단백질을 분리하는 단계.

【청구항 17】

제15항 또는 제16항에 있어서,

생리 활성 폴리펩티드는 인간 성장호르몬(hGH), 인터페론(IFN), 과립구 증식인자(G-CSF), 17번 시스테인이 세린으로 치환된 아미노산 서열을 갖는 과립구 증식인자 유도체(¹⁷S-G-CSF 변이체: HM10411), 적혈구 생성 촉진인자(EPO), 인슐린, 인터루킨, GM-CSF 및 종양괴사인자(TNFR)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 18】

제15항 또는 제16항에 있어서,

수용성 중합체는 분자량이 1,000 내지 100,000 달톤인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

【청구항 19】

제18항에 있어서,

수용성 중합체는 반응 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 말레이미드(maleimide) 그룹 및 석시나미드(succinamide) 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 그룹을 양쪽 말단에 갖는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

【청구항 20】

제19항에 있어서,

석시나미드 유도체는 석시니미딜 프로피오네이트, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

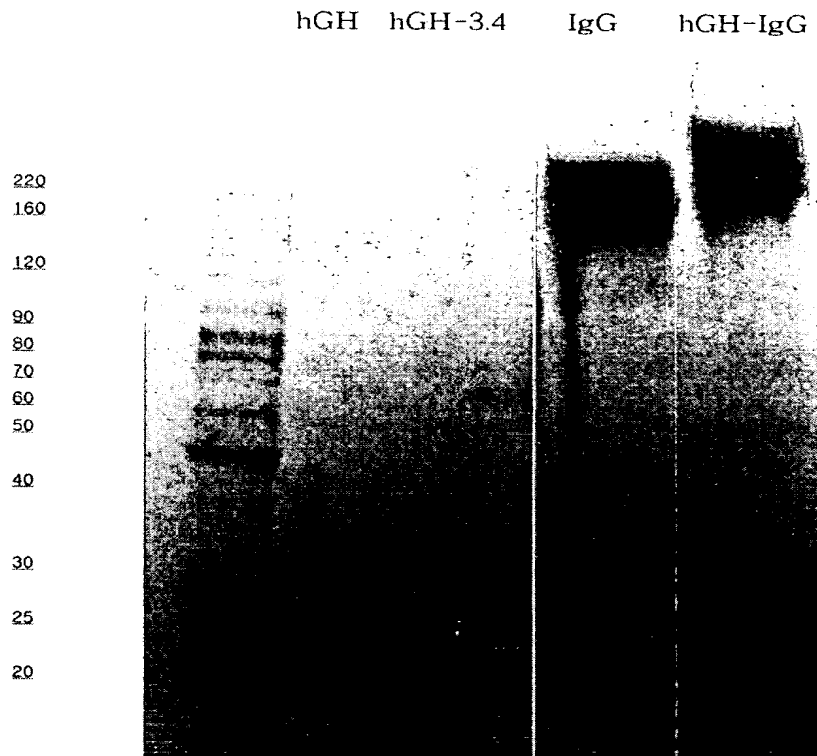
【청구항 21】

제18항에 있어서,

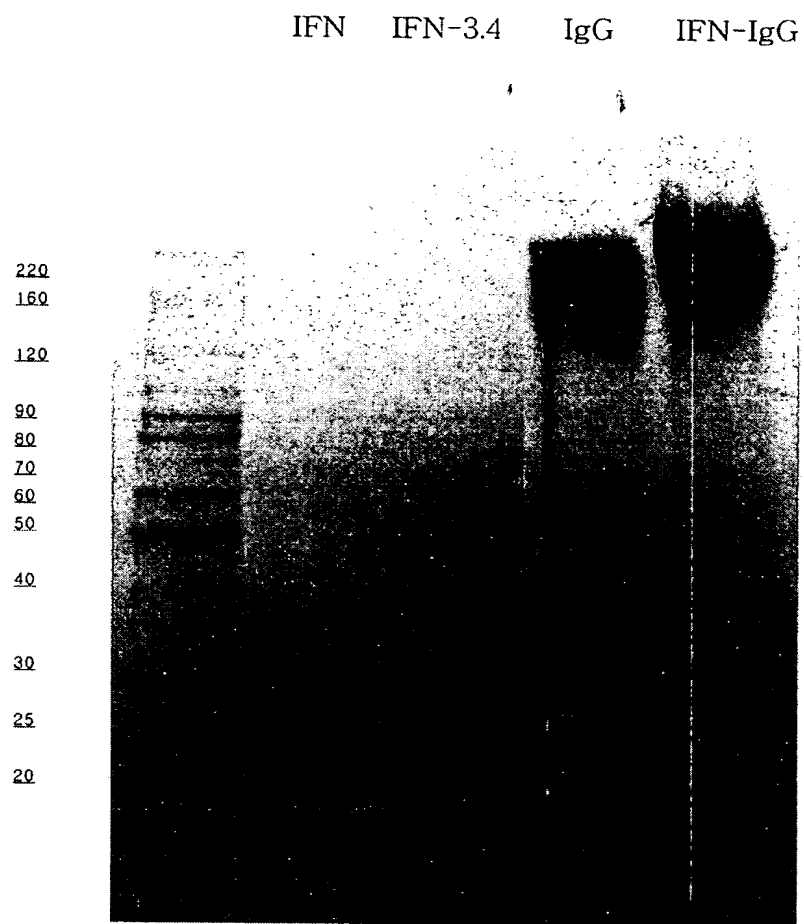
수용성 중합체는 한쪽 말단에 말레이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에 알데히드 또는 프로피온 알데히드 그룹을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

【도면】

【도 1】



【도 2】



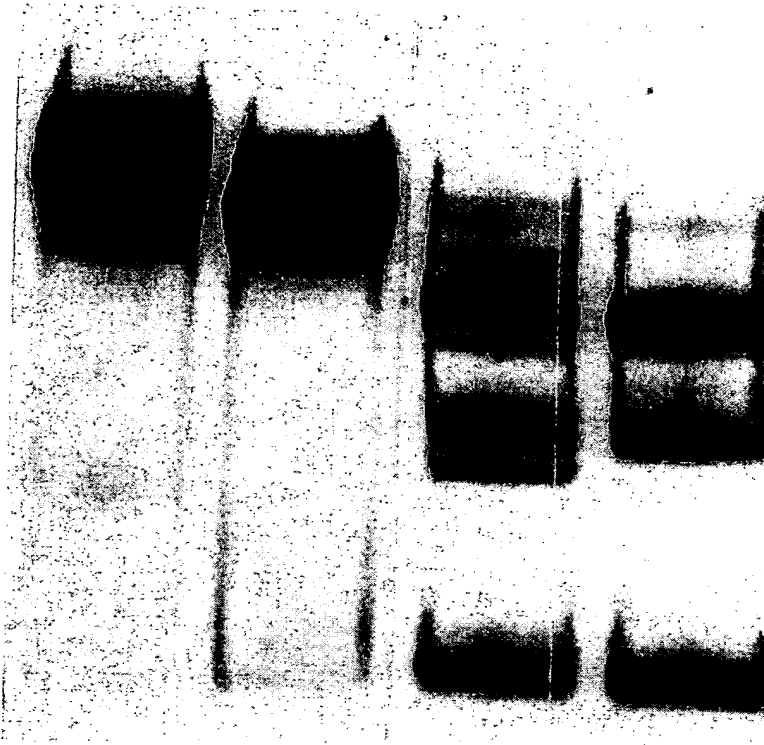


1020030015744

출력 일자: 2003/7/16

【도 3】

hGH-IgG IgG hGH-IgG IgG
[DTT 미 처리] [DTT 처리]



【도 4】

